

08.10.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

JP04/14926

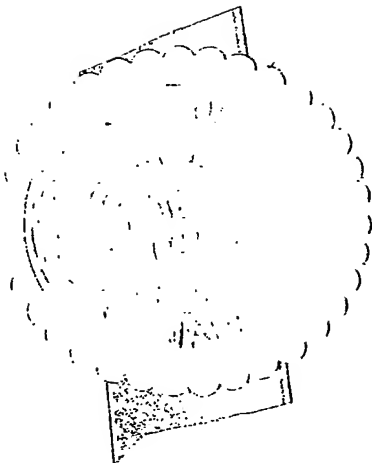
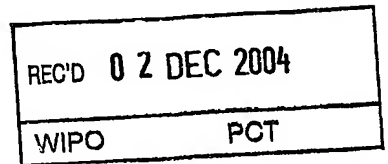
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年10月10日

出願番号
Application Number: 特願2003-352729
[ST. 10/C]: [JP2003-352729]

出願人
Applicant(s): 旭化成メディカル株式会社

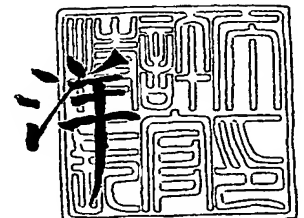


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A31671A
【提出日】 平成15年10月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式会社内
 【氏名】 寺嶋 修司
【発明者】
 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式会社内
 【氏名】 安武 幹智
【特許出願人】
 【識別番号】 000116806
 【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下 (a) ~ (d) を少なくとも含む工程:

(a) 少なくとも必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離する細胞分離工程、

(b) 必要細胞を、貯留部と凍結保存部を有する貯留バッグに移行させ貯留する細胞貯留工程、

(c) 貯留バッグに移行させた必要細胞を、前記貯留バッグ内で、凍結保存部を回転半径上の回転軸から遠い方向にセットして遠心分離する細胞濃縮工程、

(d) 濃縮された必要細胞を、空気を含まない状態で凍結保存部に密封し溶断分離する容器分離工程、

(e) 必要細胞が密封された凍結保存部を凍結し保存する凍結保存工程、
を順番に行い、且つ少なくとも前記 (b) ~ (e) の工程を密閉系で行う細胞の凍結保存方法。

【請求項 2】

前記必要細胞の貯留部が、凍結保存部から狭窄部を介して徐々に断面積を広める拡大部を有する形状である請求項 1 記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 3】

前記必要細胞の貯留部は、狭窄部が前記 (d) の容器分離工程において溶断分離部として用いられ、凍結保存部が前記 (e) の凍結保存工程において必要細胞の凍結保存用容器として用いられるものである請求項 1 または 2 記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 4】

前記必要細胞の凍結保存部が必要細胞の取出し口を有する請求項 1 乃至 3 の何れかに記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 5】

前記必要細胞の凍結保存部または／および前記必要細胞の貯留部が凍害保護剤導入部を有する請求項 1 乃至 4 の何れかに記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 6】

前記必要細胞の貯留部が必要細胞の貯留バッグ内のエア排出用フィルターを有する請求項 1 乃至 5 の何れかに記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 7】

前記必要細胞の貯留部が必要細胞の貯留バッグ内のエア排出用導管を必要細胞の導管とは独立して有する請求項 1 乃至 6 の何れかに記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 8】

前記 (d) の容器分離工程の前に、前記凍害保護剤導入部から凍害保護剤を添加する請求項 1 乃至 7 記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 9】

前記 (d) の容器分離工程の後に、前記凍害保護剤導入部から凍害保護剤を添加する請求項 1 乃至 7 記載の細胞の凍結保存方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 の何れかに記載の細胞の凍結保存方法を用いる、細胞凍結物を調整する方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法により調整される細胞凍結物。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞の凍結保存方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞含有液中の有核細胞などの必要細胞を分離、濃縮して凍結保存する方法に関する。更に詳しくは、本発明は、凍結保存用細胞含有液中の有核細胞などの必要細胞の濃度を高め、凍結保存用細胞含有液の容積を少なくするための上記必要細胞の凍結保存方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、白血病などの造血器腫瘍及び固形癌の化学療法における副作用である造血障害に対して、末梢血、骨髓、臍帯血の中の造血幹細胞を移植することが盛んに行われるようになった。そのほとんどの場合、細胞は移植前まで凍結保存されるが、凍結保存には莫大な費用がかかるため、通常凍結前に赤血球や血漿など移植に不要な成分を除去して保存容積を削減する処理が施される。

【0003】

従来、血液から治療に必要な成分を分離する方法として、比重液（ファルマシア社製 Ficoll 液）を用いる比重遠心法、特許文献 1 に開示されている赤血球凝集法、特許文献 2 に開示されているバフィーコート法、特許文献 3 に開示されているフィルター法、抗体を用いたアフィニティ分離法などが行われてきた。これらの方法で分離した細胞は、凍結容器に移す前に血液バッグなど一旦別の容器に移送され、洗浄されたり、遠心分離で液性成分を除去して濃縮されたり、凍害保護剤を加えられるなどの処理が施される。しかしながら、細胞を別の容器に移し変える際、細菌汚染の問題や容器内部に細胞濃厚液が付着、残留して細胞のロス招く問題があった。この問題を解決する方法として、特許文献 4 では、培養細胞を凍結保存する際の移し変えによる細胞のロス、細菌汚染を防ぐ目的で、培養瓶で培養された培養細胞を移し変えた凍結容器内で遠心分離、凍害保護剤を注入する技術が開示されている。しかしながら、特許文献 4 による技術は密閉系でなく細菌汚染の問題が十分解決できない、また凍結容器内の空気を排出する工程がなく、凍結容器内に残留する空気によって凍結保存容積を小さくできないだけでなく、凍結解凍時に凍結容器破損の問題がある。

【0004】

以上のように、細胞浮遊液から目的細胞を分離、濃縮、凍結保存する既存の技術には、改良すべき多くの課題が残されている。目的細胞のロス、細菌汚染、凍結容器破損の問題なく、細胞含有液中の目的細胞を分離、濃縮し、凍結保存容積を削減する方法の確立が望まれている。

【0005】

また、前述の特許文献 3 では、フィルターで分離された目的細胞を移送の手間を省くために凍結バッグで受ける方法が開示されているが、凍結バッグごと遠心分離し、必要細胞を濃縮することすることは一切記載されていない。

【0006】

【特許文献 1】特開 2000-7571 号公報

【特許文献 2】特開昭 55-141247 号公報

【特許文献 3】国際公開第 98/32840 号パンフレット

【特許文献 4】特開昭 57-83284 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液から必要細胞を分離、遠心濃縮、凍結保存する際、必要細胞のロス、細菌汚染、凍結容器破損のリスクを低減しながら凍結保存容積を削減できる細胞の凍結保存方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離、貯留、遠心濃縮、密封および凍結保存する一連の作業において、必要細胞を分離する以外の工程を密閉系の同一容器内で行い、少なくとも貯留から凍結保存までの工程を密閉系で行うことにより、必要細胞のロス、細菌汚染のリスクを低減でき、また空気を含まない状態で密封することにより、凍結保存容積を削減可能なだけでなく、凍結容器破損のリスクを低減できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

(1) 以下 (a) ~ (d) を少なくとも含む工程：

(a) 少なくとも必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離する細胞分離工程、

(b) 必要細胞を、貯留部と凍結保存部を有する貯留バッグに移行させ貯留する細胞貯留工程、

(c) 貯留バッグに移行させた必要細胞を、前記貯留バッグ内で、凍結保存部を回転半径上の回転軸から遠い方向にセットして遠心分離する細胞濃縮工程、

(d) 濃縮された必要細胞を、空気を含まない状態で凍結保存部に密封し溶断分離する容器分離工程、

(e) 必要細胞が密封された凍結保存部を凍結し保存する凍結保存工程、
を順番に行い、且つ少なくとも前記 (b) ~ (d) の工程を密閉系で行う細胞の凍結保存方法、

【0010】

(2) 前記必要細胞の貯留バッグが、凍結保存部から狭窄部を介して徐々に断面積を広める拡大部を有する形状である (1) 記載の細胞の凍結保存方法、

(3) 前記必要細胞の貯留バッグは、狭窄部が前記 (d) の容器分離工程において溶断分離部として用いられ、凍結保存部が前記 (e) の凍結保存工程において必要細胞の凍結保存用容器として用いられるものである (1) または (2) 記載の細胞の凍結保存方法、

(4) 前記必要細胞の凍結保存部が必要細胞の取出し口を有する (1) 乃至 (3) の何れかに記載の細胞の凍結保存方法、

(5) 前記必要細胞の凍結保存部または／および前記必要細胞の貯留部が凍害保護剤導入部を有する (1) 乃至 (4) の何れかに記載の細胞の凍結保存方法、

【0011】

(6) 前記必要細胞の貯留部が必要細胞の貯留バッグ内のエア排出用フィルターを有する (1) 乃至 (5) の何れかに記載の細胞の凍結保存方法、

(7) 前記必要細胞の貯留部が必要細胞の貯留部バッグのエア排出用導管を必要細胞の導管とは独立して有する (1) 乃至 (6) の何れかに記載の細胞の凍結保存方法、

(8) 前記 (d) の容器分離工程の前に、前記凍害保護剤導入部から凍害保護剤を添加する (1) 乃至 (7) 記載の細胞の凍結保存方法、

(9) 前記 (d) の容器分離工程の後に、前記凍害保護剤導入部から凍害保護剤を添加する (1) 乃至 (7) 記載の細胞の凍結保存方法、
を含む。

【0012】

(10) (1) から (9) の何れかに記載の細胞の凍結保存方法を用いる、細胞凍結物を調整する方法。

(11) (10) に記載の方法により調整される細胞凍結物。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離、貯留、遠心

濃縮、密封および凍結保存する一連の作業において、必要細胞を分離する工程以外の工程を同一容器内で行い、少なくとも貯留から凍結保存までの工程を密閉系で行うため、必要細胞のロス、細菌汚染のリスクを低減しながら凍結保存容積を削減できる。また、必要細胞を凍結容器に空気を含まない状態で密封するため、凍結保存容積を削減可能なだけでなく、凍結容器破損のリスクを低減できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明で言う必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液とは、骨髓、末梢血、G-CSFなどの造血因子投与による動員末梢血、臍帯血、あるいはこれらを生理食塩水、細胞培養用培地、緩衝液、抗凝固剤などで希釈したものなどが挙げられる。

【0015】

必要細胞の例としては、白血球、単核球、リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、造血幹細胞、間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、有核赤血球など、細胞治療、診断等に有用で分離回収を必要とする有核細胞が挙げられる。

【0016】

一方、不要細胞の例としては、赤血球、血小板、顆粒球など、必要細胞と混在している凍結解凍時の破壊細胞によるレシピエントへの副作用や必要細胞の低回収等の悪影響を持つ細胞が挙げられる。

【0017】

本発明で言う「少なくとも必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離する細胞分離工程」とは、遠心法、比重遠心法、赤血球凝集法、パフィーコート法、抗体を用いたアフィニティ分離法、フィルター法など既存の細胞分離方法、或いはこれらを組み合わせた方法であればいずれの方法でもよいが、閉鎖系で細胞分離が可能な赤血球凝集法、パフィーコート法、フィルター法が好ましく、その中でもフィルター法が必要細胞と不要細胞の分離効率が高いため凍結保存容積を小さくできるため最も好ましい。

【0018】

本発明において、細胞分離工程における不要細胞の混入量としては、凍結保存容積を小さくするためにもできるだけ少ない方が好ましい。具体的には、凍害保護液を加える直前の必要細胞濃縮液の容積に対する混入不要細胞の容積の比率は、65%以下が好ましく、45%以下がより好ましい。65%を超える場合、後述する容器分離工程において、必要細胞を遠心濃縮後、上清を除去する際の液面或いは必要細胞濃縮液を密封する際の溶断面近くまで必要細胞が接近し、必要細胞を失う可能性が高くなる。

【0019】

本発明で言う「貯留バッグ」とは、凍結保存部と貯留部およびそれらを介する狭窄部からなり、さらに、前記貯留部には必要細胞の導入口が取り付けられていて、必要細胞が狭窄部を介して流通可能な形状を有する。貯留バッグの形状の一例を図1～図3に示す。図1～図3において、1は必要細胞導入口、2はエア排出フィルター、3は貯留部、4は狭窄部（溶断分離部）、5は凍結保存部、6は凍害保護剤導入部、7は必要細胞の取り出し口である。

本発明で言う「貯留部」は、可撓性の材質からなる必要細胞を貯留可能な部分である。必要細胞導入口1は、貯留バッグ13のいずれの位置に取り付けられていてもよいが、操作上の理由から貯留部3に付いていることが好ましい。

前記貯留バッグ13はその内部形状が重要である。すなわち、図示したように、凍結保存部5から狭窄部（溶断分離部）4を介して徐々に断面積を広める拡大部を有する形状（貯留部3の一部において断面積が変化する形状）であると、aの方向に遠心力を負荷した時に凍結保存部5を狭窄部4で溶断分離しやすく且つ貯留部3の必要細胞を効率的に凍結保存部5に導くために好ましい。ここで、徐々に断面積を広げる拡大部の角度（図1～3のb）としては、20度以上150度以下が好ましく、45度以上120度以下がより好ましい。20度未満の場合、貯留部3が長方形の長辺方向が長くなり、遠心分離時に貯留バッグ13が遠心カップに入らないなど取扱性が悪くなる。一方、150度より大きい場

合、必要細胞が拡大部に蓄積して凍結保存部 5 に十分導くことができず細胞のロスを招く。また、貯留部 3 および凍結保存部 5 は分離された必要細胞液が貯留されない状態でも空間を確保するように立体成型されていてもよい。

本発明で言う「凍結保存部」とは、耐低温性を有する可撓性の性質で、細胞含有液から分離された必要細胞を貯留部と共に一旦貯留し、その後、遠心分離で濃縮された必要細胞を収容可能な部分である。耐低温性を有する材質としては、ポリエチレン、エチレン酢酸ビニル共重合体 (EVA)、パーフルオロエチレンプロピレン (FEP) などのフッ素樹脂、ポリイミド等が挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0020】

本発明で言う「分離された必要細胞を血液バッグ内で、凍結保存部を回転半径上の回転軸から遠い方向にして遠心分離する細胞濃縮工程」とは、貯留バッグ 13 に移行された必要細胞を、凍結保存部 5 に濃縮させるために強い遠心力が負荷されるよう、必要細胞が貯留された貯留バッグ 13 を固定して遠心分離することである。具体的には遠心時に遠心カップの底面側に凍結貯留部 5 を配向し、固定して遠心分離することである。

【0021】

本発明で言う「濃縮された必要細胞を、空気を含まない状態で凍結保存部に密封し溶断分離する容器分離工程」とは、凍結保存部 5 の空気を貯留部 3 側に追い出しながら、凍結保存部内に沈降した必要細胞を凍結保存部外部に漏出しないようにヒートシーラーで凍結容器材質の融点以上の熱を与えて必要細胞を封じ込めた後、ハサミやカッターなどを用いて凍結保存部 5 を貯留部 3 から切り離すことを言う。凍結保存部 5 内の空気を追い出す方法としては、貯留部 3 と凍結保存部 5 を介する狭窄部 4 を上に向けて凍結保存部 5 の空気がある部分を指でつまむまたは指ではじいて貯留部 3 側へ追いやる方法が挙げられる。更に、上清を抜かずにそのまま細孔部でヒートシールを行うと空気が入りにくく、また凍結保存部 5 内の液の動きが抑えられて必要細胞がロスしにくい。好ましい。

【0022】

本発明で言う「必要細胞の取り出し口」とは、凍結保存部 5 の内部と外部空間とを連通可能な耐低温性の流通部であり、凍結保存部 5 を解凍処理後、内部の必要細胞を取り出す機能を有しているものを言う。例えば、ルアアダプターにスクリュキャップで閉じられたもの、ラバー栓などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0023】

本発明で言う「凍害保護剤導入部」とは、凍結保存部 5 の内部と外部空間とを連通可能な耐低温性の流通部であり、貯留部 3 または凍結保存部 5 に凍害保護剤を導入可能な機能を有しているものを言う。例えば、ルアアダプターにスクリュキャップで閉じられたもの、ラバー栓などがあるが、これらに限定されるものではない。また、この凍害保護剤導入部は凍害保護剤を貯留部 3 または凍結保存部 5 に導入後はヒートシーラー等で溶断分離して切り離すと、凍結保存部 5 から突起物をなくすことができ破損のリスクを低減できる。

凍害保護剤はジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセリン、デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ (HES)、ポリビニルピロリドン (PVP) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。更に凍害保護剤を貯留部または凍結保存部に導入するタイミングとしては、容器分離工程の前後が導入量を少なくできるため好ましい。一般によく使用されるジメチルスルホキシドは常温では毒性を有するため、細胞濃縮工程より前の場合、凍害保護剤との接触時間が長くなり、細胞にダメージを与えるため特に好ましくない。

【0024】

本発明で言う「エア排出用フィルター」とは、貯留部 3 に具備され、貯留部 3 内のエアを貯留部 3 外へ排出する部分であり、内部のエアは外部に排出できるが外部からの汚染物の侵入を阻止する機能を有する。貯留バッグ 13 において、分離された必要細胞を貯留部 3 に移行する際、貯留部 3 内は必要細胞液だけでなく元々貯留部 3 に存在していたエアや必要細胞の移行時に伴ってきたエアが存在することになり、貯留部 3 および凍結保存部 5

が膨れて破裂の危険性がある。そのため、エア排出用フィルターを貯留部 3 に具備することにより、破裂を防止できるため好ましい。フィルターの濾材が除菌作用を有する多孔質膜は貯留部 3 内に細菌の流入を防止でき好ましい。この多孔質膜は、通気が容易でバクテリアやウイルスの流入を防止可能な孔径を有するもので、 $0.1 \sim 0.6 \mu\text{m}$ の孔径が好ましい。また、万一細胞含有液に接触しても湿らず通気が可能な疎水性のものが好ましい。また、同じ目的で貯留部 3 に「エア排出用導管」を必要細胞の導管とは別に設けてもよい。この導管は閉鎖系で貯留部 3 内のエアを血液バッグや細胞分離する工程で使用したシステムと連結して、排出することができる。

【0025】

本発明で言う「必要細胞が密封された凍結保存部を凍結し保存する凍結保存工程」とは、細胞の凍結保存方法として一般に行われている方法であれば特に限定はないが、落下などの衝撃による破損を防ぐため、凍結保存部 5 は金属製のキャニスターに入れて保護した方が好ましく、細胞へのダメージを低減するために液体窒素保存前にプログラムフリーザーで凍結保存した方が好ましい。液体窒素での凍結保存は気相または液相のどちらで行ってもよい。

【0026】

本発明による細胞の凍結保存方法においては、前記した少なくとも (b) ~ (e) の工程を密閉系で行うことを特徴としている。本発明でいう「密閉系」とは、必要細胞のロス、細菌汚染のリスクを低減できるように、外界に対して閉鎖されている系であれば任意の構成をとることができ、好ましくは、工程 (b) ~ (e) の間に、必要細胞が外界の空気と接触しないような構成を採用することができる。さらに好ましくは、例えばフィルター法による細胞分離を採用することにより、前記した (a) の工程を含め (a) ~ (e) の全工程を密閉系で行えば、細菌汚染のリスクが格段に低くなる。

【0027】

次に、本発明による細胞の凍結保存方法の一例として、図 4 に示したシステムのとおり、細胞分離をフィルター法で行った場合について説明する。なお、この例においては、図 1 の凍結保存部 5 を有する貯留部 3 を用いている。

図 4 において、8 は細胞含有液バッグ、91、92、93 は血液導管、101、102、103 はクランプ、111、112 は T 字管、12 は細胞分離フィルター、13 は凍結保存部を有する貯留部、14 は回収液注入口、15 は細胞分離フィルターから排出された不要細胞を貯留するドレインバッグである。

まず、クランプ 101 と 103 を閉じ、細胞含有液バッグ 8 と血液導管 1 を接続する。次に、クランプ 101 と 103 を開け、必要細胞を捕捉し不要細胞は通過させる濾材を組み込んだ細胞分離フィルター 12 に細胞含有液を導入し、不要細胞をフィルターから排出させる。このように濾過した細胞含有液はドレインバッグ 15 に排出され、細胞含有液バッグ 8 内の全ての細胞含有液が細胞分離フィルター 12 に導入され、排出させた後、クランプ 101、103 を閉じる。次に、クランプ 102 を開けて回収液注入口 14 から回収液を細胞分離フィルター 12 に導入し、濾材に捕捉されている必要細胞を、貯留バッグ 13 に移行させ、貯留させる。貯留バッグ 13 に必要細胞が貯留される際、エア排出用フィルター 2 から貯留バッグ 13 内のエアを排出する。次に、貯留バッグ 13 の必要細胞導入口 1 をヒートシールして、貯留バッグ 13 を細胞分離システムから溶断分離する。このように切り離した貯留バッグ 13 を、凍結保存部 5 が遠心カップの底面に来るように固定して遠心分離する。遠心分離によって必要細胞を凍結保存部 5 に濃縮した後、溶断分離部 4 をヒートシーラーで溶断分離し、凍結保存部 5 を密閉状態で分離する。次に凍害保護剤導入部 6 から凍害保護剤を導入し、その後凍結保存部 5 を凍結保存する。

【0028】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。以下の実施例及び比較例は臍帯血から単核球をフィルターで分離した後、遠心濃縮し、凍結保存する方法について例示する。この場合の必要細胞は単核球で、不要細胞は赤血球である。

【実施例】

【0029】

実施例 1:

(1) 細胞分離フィルターの作製

上容器と下容器からなり、組み立てた後の内寸が縦 43 mm、横 43 mm、高さ 2.9 mm (有効濾過断面積 18.5 cm^2 、内容積 7 cm^3) で液体流出口と液体流入口を最長対角線上にもつポリカーボネート製容器の入口側から、第 1 層目に平均繊維径 $12 \mu\text{m}$ のポリエステル不織布 0.14 g を、第 2 層目に $1.7 \mu\text{m}$ のポリエステル不織布 1.28 g を、第 3 層目に平均繊維径 $1.1 \mu\text{m}$ のポリエステル不織布 0.19 g を充填し、細胞分離フィルター 12 を得た。尚、第 1 層目、第 2 層目および第 3 層目の充填密度はそれぞれ 0.20 g/cm^3 、 0.24 g/cm^3 および 0.20 g/cm^3 であった。

また、前記細胞分離フィルター 12 の不織布に血小板通過性を付与する目的で、親水性ポリマーのコーティングを行った。即ち、ヒドロキシエチルメタクリレート・ジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体 (モル比で 97:3) の 1% エタノール溶液を前記細胞分離フィルター 12 の液体流入口から通液し、窒素ガスで余分なポリマー溶液をパージした後、 60°C で 8 時間以上真空乾燥機で乾燥させた。

【0030】

(2) 細胞分離システム

図 4 の細胞分離システムを使用した。

【0031】

(3) 貯留バッグ

図 1 のタイプの貯留バッグを使用した。貯留部の内容積は 40 cm^3 で、凍結保存部の内容積は 5 cm^3 。材質はエチレン酢酸ビニル共重合体 (EVA) のものを使用した。

【0032】

(4) 細胞濃縮操作

事前にクランプ 101、102、103 を閉じておいた。 200 cm^3 の細胞含有液バッグ 8 に貯留された CPD 加ヒト臍帯血 100 cm^3 と血液導管 91 を接続した。クランプ 101 と 103 を開け、落差により濾過を開始した。濾過された血液はドレインバッグ 15 に貯留した。細胞含有液バッグ 8 内の全ての血液が細胞分離フィルター 12 に導入されたことを確認後、クランプ 101、103 を閉じた。次に、10% デキストラン生理食塩水溶液 (小林製薬「デキストラン 40 注」) にヒト血清アルブミンを最終濃度 3% になるように添加した液体 19 cm^3 とエア 18 cm^3 をシリンジに充填した。次に、クランプ 22 を開けて回収液注入口 6 から手動で通液し、凍結保存部 5 を有する貯留バッグ 13 に単核球を回収した。この場合の回収された細胞液量は 23 cm^3 であった。ヒートシーラーを用いて細胞分離システムから貯留バッグ 13 を切り離した後、凍結保存部 5 を遠心カップの底面側にして $1000 \text{ G} \times 15$ 分の遠心条件で遠心分離した。狭窄部 (溶断分離部) 4 までの上清を除去し、凍結保存部 5 の空気を追い出しながらヒートシーラーを用いて溶断分離部 4 で溶断し、貯留部 3 から切り離した。次に凍結保存部 5 を指で押さえながら沈さをほぐした。凍結保存部 5 の表面を冷剤で冷やししながら凍害保護剤導入部 6 から 50% ジメチルスルホキシドをシリンジポンプを用いて $0.3 \text{ cm}^3/\text{分}$ の流速で 1 cm^3 加えた。最終容積は 5 cm^3 であった。その後、 -80°C 中で 2 時間静置し、液体窒素の気相で凍結保存した。

【0033】

(5) 分析

凍結保存前に必要細胞の取出し口 7 からサンプリングし、元の臍帯血と合わせて多項目自動血球分析装置 (シスメックス社 SF3000) を用いて単核球数を測定し、回収率を計算した。

【0034】

(6) 結果

本細胞濃縮操作での単核球回収率は 85% で、凍結解凍後、凍結保存部 5 の破損は見ら

れなかった。

【0035】

比較例 1

フィルター法で分離された単核球をコニカルチューブに移し変えて遠心濃縮し、更に単核球濃縮液を貯留バッグ 13 に移し変えて凍結保存した。

【0036】

(1) 細胞分離フィルターの作製

実施例 1 と同じものを使用した。

【0037】

(2) 細胞分離システム

図 4 の細胞分離システムで、貯留バッグ 13 の代わりに、本発明でいう狭窄部 4 や凍結保存部 5 を有さない通常の血液バッグを用いた。

【0038】

(3) 貯留バッグ

実施例 1 と同じものを使用した。

【0039】

(4) 細胞分離操作

実施例 1 と同様に図 4 の細胞分離システムで臍帯血を処理し、本発明でいう狭窄部 4 や凍結保存部 5 を有さない通常の血液バッグに必要な細胞を回収した。回収された有核細胞液 23 cm^3 を 14 cm^3 コニカルチューブ 2 本に移し変えて $1000 \text{ G} \times 15$ 分の遠心条件で遠心分離した。容積が 4 cm^3 となるように上清を除去し沈さを再浮遊させた後に、 50% ジメチルスルホキシド 1 cm^3 を冷剤で冷やしながらか 0.3 cm^3 / 分の流速で加えた。その後、この細胞濃縮物を図 1 のタイプの貯留バッグ 13 に移し換え、実施例 1 と同様の方法で凍結保存した。

【0040】

(5) 結果

本細胞濃縮操作での単核球回収率は 50% であった。凍結解凍後、凍結保存部 5 の破損は見られなかった。

【0041】

比較例 2

実施例 1 において、凍結保存部 5 内の空気を抜く操作を行わずに凍結保存した。

【0042】

(1) 細胞分離フィルターの作製

実施例 1 と同じものを使用した。

【0043】

(2) 細胞分離システム

図 1 の細胞分離システムを使用した。

【0044】

(3) 貯留バッグ

実施例 1 と同じものを使用した。

【0045】

(4) 細胞分離操作

凍結保存部 5 に 2 cm^3 のエアを封入して凍結保存した以外は実施例 1 と同様に処理した。

【0046】

(5) 結果

本細胞濃縮操作での単核球回収率は 85% であったが、凍結解凍後、凍結保存部 5 の破損が見られた。

【産業上の利用可能性】

【0047】

本発明の細胞の凍結保存方法は、骨髓、臍帯血、末梢血等の細胞含有液から単核球等の必要細胞を赤血球等の不要細胞から分離し、凍結保存するために使用でき、必要細胞のロス、細菌汚染のリスク、凍結容器破損のリスクを低減するのに有効な手段として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、本発明の貯留バッグの一例を示す。

【図2】図2は、本発明の貯留バッグの一例を示す。

【図3】図3は、本発明の貯留バッグの一例を示す。

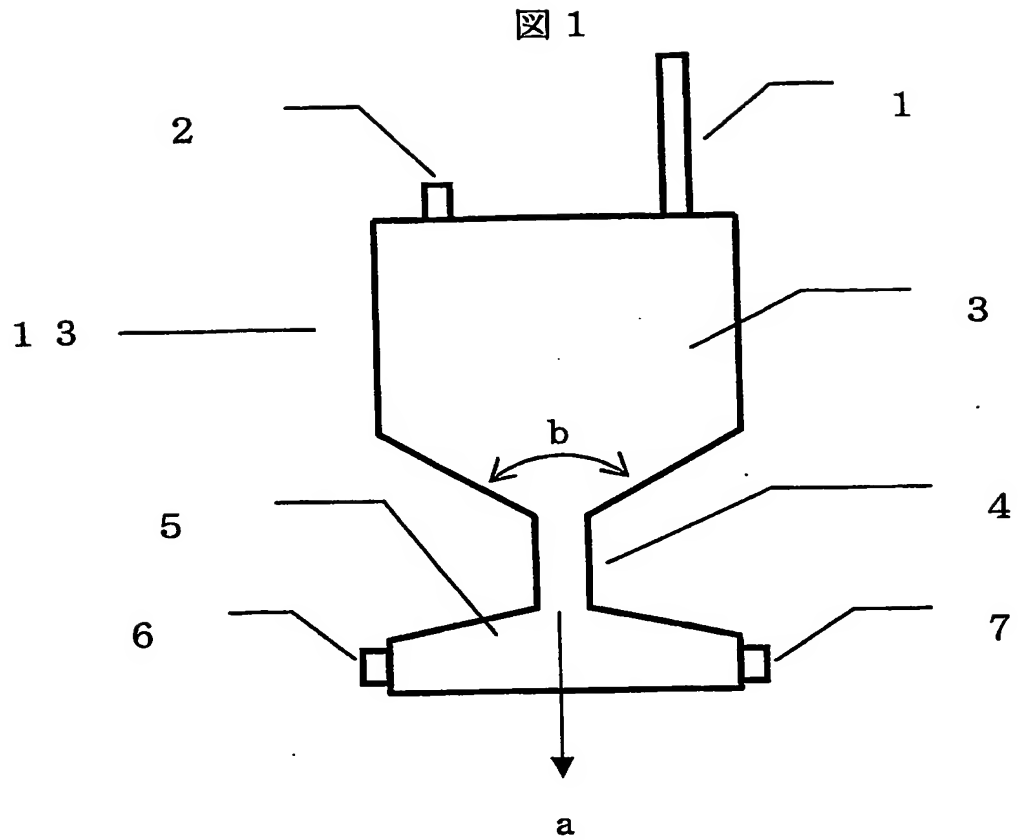
【図4】図4は、本発明による細胞の凍結保存方法をフィルター法を用いて行なう場合のシステムの一例を示す図である。

【符号の説明】

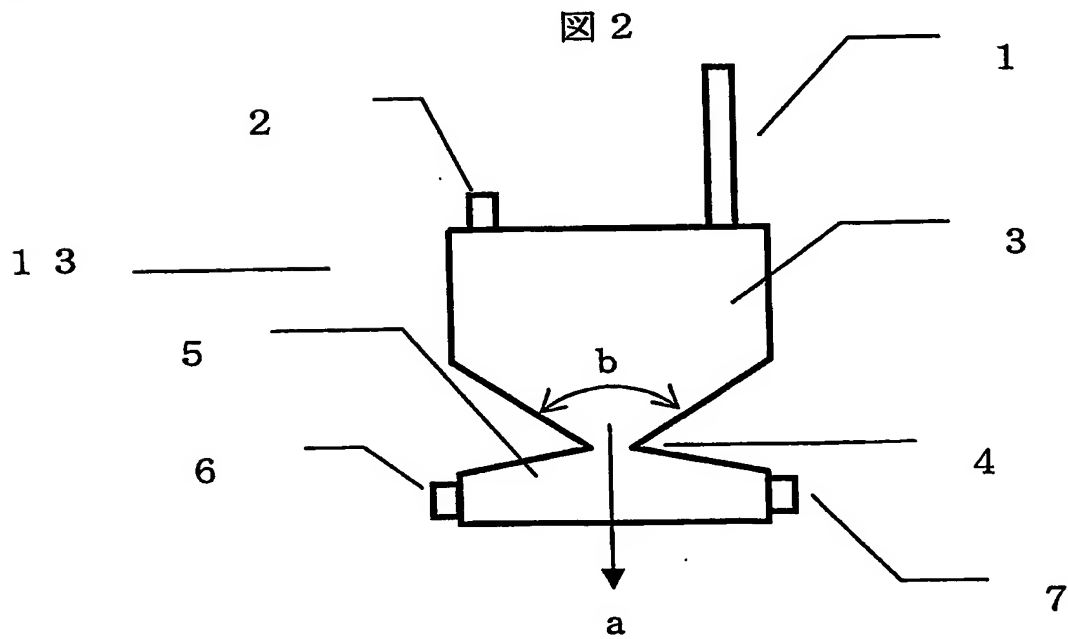
【0049】

- 1 必要細胞導入口
- 2 エア排出用フィルター
- 3 貯留部
- 4 狭窄部（溶断分離部）
- 5 凍結保存部
- 6 凍害保護剤導入部
- 7 必要細胞の取出し口
- 8 細胞含有液バッグ
- 9 1 血液導管
- 9 2 血液導管
- 9 3 血液導管
- 10 1 クランプ
- 10 2 クランプ
- 10 3 クランプ
- 11 1 T字管
- 11 2 T字管
- 1 2 細胞分離フィルター
- 1 3 貯留バッグ
- 1 4 回収液注入口
- 1 5 ドレインバッグ

【書類名】 図面
【図 1】

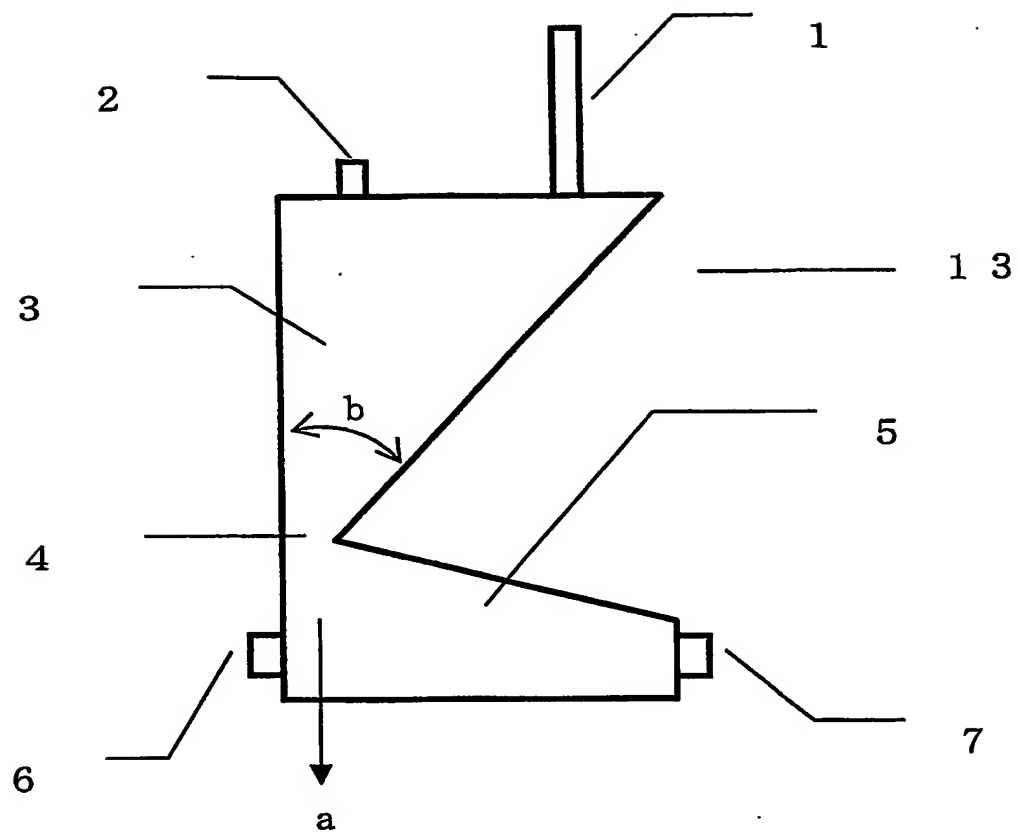


【図 2】

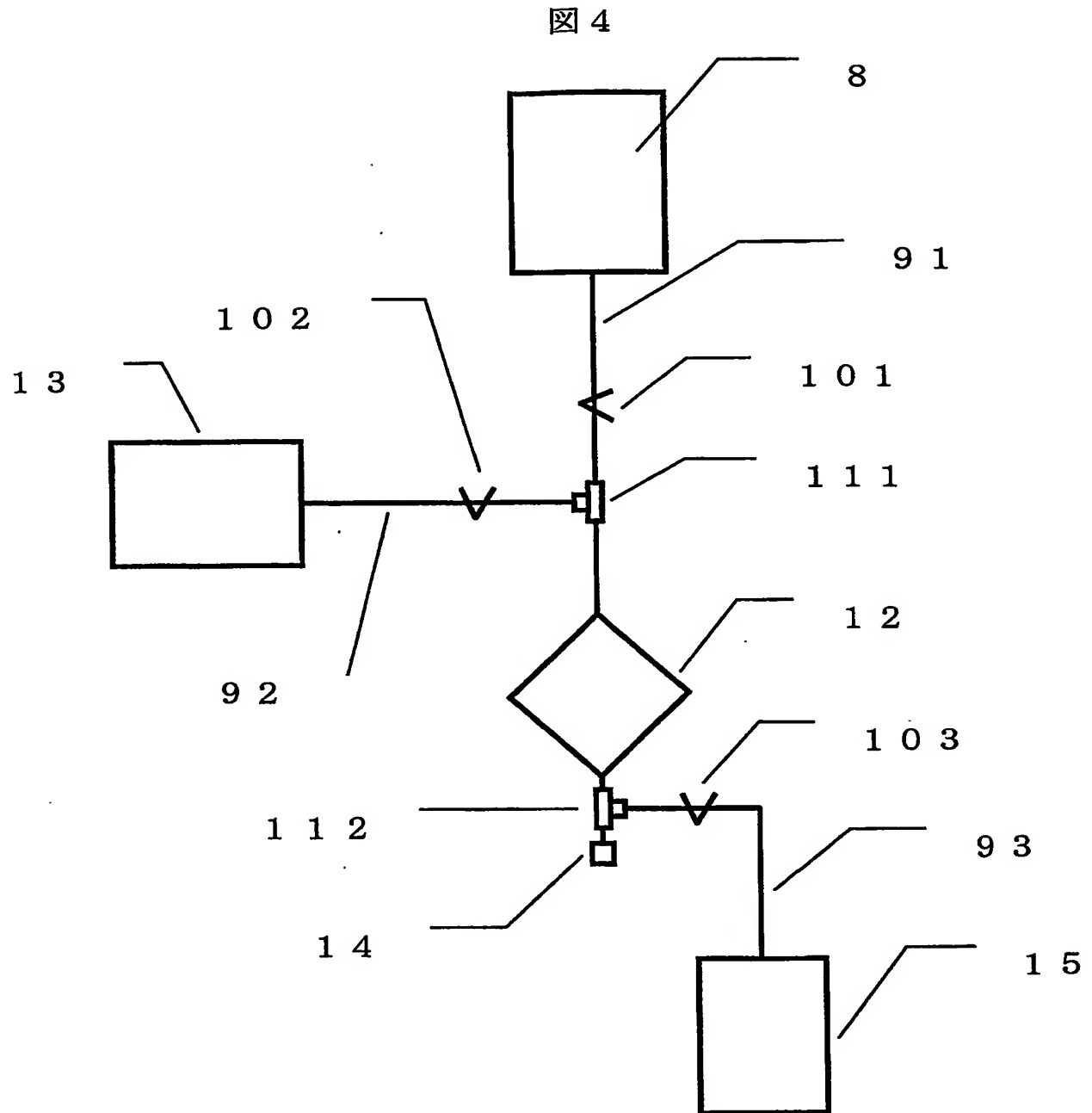


【図 3】

図 3



【図 4】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 必要細胞と不要細胞とを含む細胞含有液から必要細胞を分離、遠心濃縮、凍結保存する際、必要細胞のロス、細菌汚染、凍結容器破損のリスクを低減しながら凍結保存容積を削減できる細胞の凍結保存方法を提供すること。

【解決手段】 以下(a)～(d)を少なくとも含む工程：

- (a) 少なくとも必要細胞と不要細胞を含む細胞含有液から必要細胞を分離する細胞分離工程、
 - (b) 必要細胞を、貯留部と凍結保存部を有する貯留バッグに移行させ貯留する細胞貯留工程、
 - (c) 貯留バッグに移行させた必要細胞を、前記貯留バッグ内で、凍結保存部を回転半径上の回転軸から遠い方向にセットして遠心分離する細胞濃縮工程、
 - (d) 濃縮された必要細胞を、空気を含まない状態で凍結保存部に密封し溶断分離する容器分離工程、
 - (e) 必要細胞が密封された凍結保存部を凍結し保存する凍結保存工程、
- を順番に行い、且つ少なくとも前記(b)～(e)の工程を密閉系で行う細胞の凍結保存方法。

【選択図】 なし

特願 2003-352729

出願人履歴情報

識別番号

[000116806]

1. 変更年月日 1998年 6月11日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都千代田区神田美土代町9番地1
氏 名 旭メディカル株式会社
2. 変更年月日 2004年10月 1日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都千代田区神田美土代町9番地1
氏 名 旭化成メディカル株式会社